



УДК 543.54:547.973

АНТОЦИАНЫ ПЛОДОВ ШЕСТИ ВИДОВ *AMELANCHIER* SP.

А.Н. Чулков
В.И. Дейнека
Л.А. Дейнека
А.В. Степанова
В.Н. Сорокопудов

Белгородский государственный
национальный исследователь-
ский университет, 308015
г.Белгород, ул. Победы 85.

e-mail: deineka@bsu.edu.ru

В настоящей работе методом обращенно – фазовой ВЭЖХ со спектрофотометрическим и с масс-спектрометрическим (ESI/MS) детектированием изучен состав антоциановых комплексов 6 видов ирги выращенной в ботаническом саду БелГУ. Показано, что во всех исследованных образцах основными компонентами были цианидин-3-галактозид, в меньших количествах содержались цианидин-3-глюкозид и цианидин-3-арабинозид. Среди минорных компонентов, которые также являются производными цианидина, найден ацилированный 3-пентозид и еще одно производное не установленного состава. Наибольшая концентрация антоцианов обнаружена в плодах ирги ольхолистной, канадской и обильноцветущей (0.250 – 0.275 г на 100 г свежих плодов), а самая наименьшая – в плодах ирги кроваво-красной (0.102 г на 100 г свежих плодов).

Ключевые слова: антоцианы, плоды, *Amelanchier* sp., ВЭЖХ, масс спектрометрия.

Введение

В современном урбанизированном мире огромное внимание уделяется природным антиоксидантам, источником которых являются плоды съедобных садовых и лесных растений [1], - в настоящее время доступных практически круглый год (зимой – в замороженном состоянии) и не имеющих непредсказуемых последствий для организма человека. К числу важнейших природных антиоксидантов относят антоцианы – водорастворимые соединения класса флавоноидов [2]. Основным признаком присутствия большого количества антоцианов – темно-синяя (темно-красная) окраска плодов. Одним из таких растений, темноокрашенные плоды которого по литературным данным [3-6] содержат большое количество антоцианов являются плоды ирги.

Ирга, *Amelanchier*, – род растений подсемейства яблоневые (*Maloideae*) семейства розоцветные (*Rosaceae*), - к настоящему моменту насчитывается от 18 до 23 видов [7]. Она отличается скороплодностью, быстрым ростом, зимостойкостью, ежегодным плодоношением. Для культивирования существуют специально выведенные сорта с крупными ягодами до 15 мм и урожайностью до 15 кг ягод с куста.

По литературным данным антоциановый состав плодов ирги может быть достаточно разнообразным. Так в работе [6] методом бумажной хроматографии в гидролизате экстракта было обнаружено три агликона – пеларгонидин, цианидин и мальвидин. Этот набор, в лучшем случае, странный, если принимать во внимание традиционные схемы биосинтеза антоцианов. Среди гликозидов были выделены 7 индивидуальных соединений вне зависимости от вида ирги (*A. spicata* (Lam.) C. Koch., *A. alnifolia* Nutt., *A. oligocarpa* Roem., и *A. sanguinea* DC.). Среди них авторы определили пеларгонидина и цианидина 3,5-диглюкозиды, 3-глюкозиды этих же антоцианидинов и цианидин-3-галактозид; гликозидный состав производных мальвидина не был установлен. Использование ВЭЖХ с масс-спектрометрией (ESI/MS) и ¹H-ЯМР [8] позволили уточнить состав комплекса антоцианов - в антоциановом комплексе плодов четырех видов рода ирга (*A. alnifolia*, *A. arborea* and *A. canadensis*) был найден в качестве основного антоциана цианидин-3-галактозид (155, 390 и 165 мг на 100 г свежих плодов, соответственно). В плодах видов *A. alnifolia* and *A. canadensis* обнаружили заметное (54 и 48 мг/100 г) содержание цианидин-3-глюкозида. В работе [4] к этому



перечню добавили еще один компонент, определенный как цианидин-3-пентозид. Впрочем, в более ранней работе [9] предполагалось существование в комплексе цианидин-3-ксилозида в качестве минорного компонента. Хроматографическим методом, сопоставлением удерживания антоцианов различных комплексов было установлено, что основные антоцианы плодов *A. ovate* те же, что и в плодах других растений подсемейства яблоневые [10]: цианидин-3-галактозид, цианидин-3-глюкозид, цианидин-3-арабинозид и еще два не идентифицированных минорных антоциана.

В коллекции Ботанического сада БелГУ собраны и находятся в фазе плодоношения шесть видов рода *Amelanchier*: ирга колосистая – *A. spicata* (Lam.) C. Koch, ирга ольхолистная – *A. alnifolia* (Nutt.) Nutt ex M. Roem, ирга кроваво-красная – *A. sanguinea* (Pursh) DC, ирга гладкая – *A. laevis* Weigand, ирга канадская – *A. canadensis* (L.) Medik и ирга обильно цветущая – *A. florida* Lindl. Настоящая работа посвящена исследованию ценности плодов этих растений как источников антоцианов.

Экспериментальная часть

Плоды ирги были собраны в ботаническом саду БелГУ в конце июня 2011 года. Антоцианы из плодов экстрагировали 0.1 М водным раствором соляной кислоты. Содержание антоцианов в плодах определяли спектрофотометрически на приборе СФ-56 при длине волны 510 нм с пересчетом на цианидин-3-глюкозид с использованием литературного коэффициента экстинкции [11].

Для идентификации антоцианов ирги в работе использован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в обращенно-фазовом варианте с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами (оборудование марки Agilent 1200 Infinity). В качестве подвижной фазы использовали смеси системы «ацетонитрил : муравьиная кислота : вода». Детектирование веществ проводили при длине волны 510 нм. Спектры индивидуальных компонентов записывали в ячейке диодно-матричного детектора в диапазоне длин волн 420-600 нм. Разделение компонентов проводили на хроматографической колонке Symmetry® C18 4.6×250 мм с термостатированием при 40°C. Скорость подвижной фазы составляла 1 мл/мин. Перед хроматографированием соляно кислые образцы антоциановых пигментов были очищены на концентрирующих патронах ДИАПАК заполненных C18 сорбентом.

Масс-спектры записывали на квадрупольном масс спектрометре Agilent 6130 LC/MS в режиме ESI (ионизация распылением в электрическом поле) с позитивным режимом сканирования в диапазоне масс 250-1200. Напряжение на фрагментаторе – 200 В. Ток на короне составлял 4 мкА. Давление газа-распылителя 2 бар, скорость газа осушителя 10 л/мин, температура газа осушителя 350°C, температура испарителя 250 °C.

Результаты и обсуждения

Антоциановый комплекс плодов всех исследованных видов ирги оказался практически одинаков в качественном отношении, с небольшими различиями в количественном соотношении между основными антоцианами. Типичная хроматограмма экстракта ирги представлена на рис.1.

По спектральным данным (вследствие практически полного совпадения в нормализованном виде) все пики №1 – №5 на рис.1. принадлежат 3-моноголикозидам цианидина, рис.2. Т.е. в исследованных образцах нет 3,5-диглюкозидов и нет производных ни пеларгонидина, ни других (кроме цианидина) антоцианидинов. Только при большой перегрузке колонки удастся по характерному гипсохромному смещению максимума абсорбции обнаружить следы производных пеларгонидина (в диапазоне времен удерживания 7.7 ÷ 7.9 мин и 9.1 ÷ 9.2 мин).

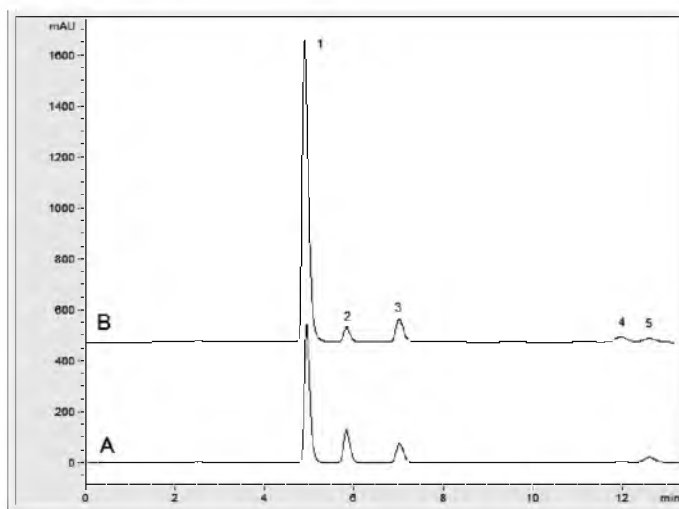


Рис.1. Хроматограммы исследуемых образцов ирги
А – ирга ольхолистная, В – ирга кроваво-красная

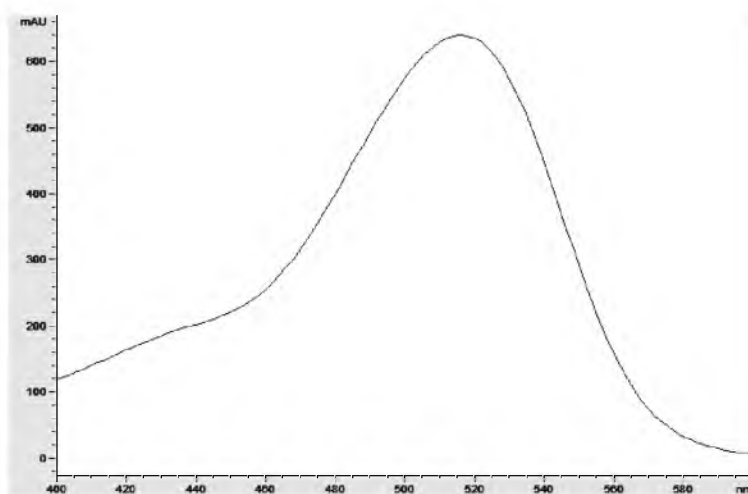


Рис. 2. Спектры компонентов антоцианов ирги

Используя совпадение удерживания антоцианов в нескольких составах подвижной фазы по методу относительного анализа удерживания [12] можно высказать предположение о составе антоцианов пиков №1-№3, рис.3.

Это – последовательно элюирующиеся цианидина-3-галактозид (Cy-3-Gala), цианидина-3-глюкозид (Cy-3-Glu) и цианидина-3-арабинозид (Cy-3-Ara) – три из пятнадцати компонентов антоцианового комплекса плодов черники [13]. Для двух оставшихся антоцианов (пики №4 и №5) тангенсы углов прямолинейных зависимостей относительного удерживания антоцианов (1.003 и 1.032, соответственно) соответствуют моногликозидам цианидина [14].

Для подтверждения состава антоцианов в работе был использован масс-спектрометрический метод с ионизацией распылением в электрическом поле (ESI/MS). Однако на спектрах, как правило, кроме пика основного молекулярного иона могут существовать и продукты фрагментации, поэтому использование этой характеристики в ряде случаев не может дать окончательный ответ на состав веществ, если учесть, что возможны многочисленные инверсии удерживания аналитов, а сле-



довательно, и совпадения времен удерживания нескольких компонентов. Но по существованию на всех спектрах, рис.4, иона с отношением $M/z = 287$ можно подтвердить цианидиновую основу всех основных антоцианов комплекса. Для пиков №1 и №2 получены одинаковые спектры, что подтверждает их цианидин-гексозидную природу ($M/z = 449$). Для пика №3 $M/z = 419$ подтверждает его принадлежность к цианидин-3-арабинозиду.

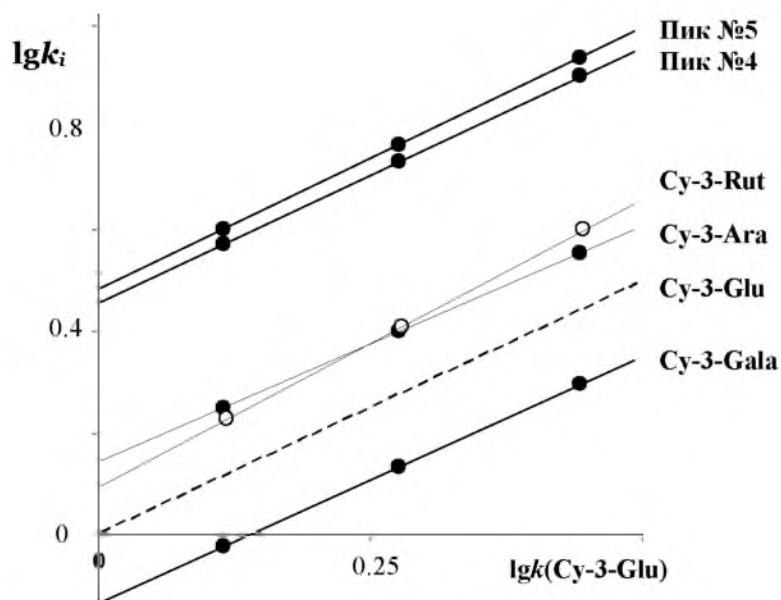


Рис. 3. Карта хроматографического разделения антоцианов ирги относительно цианидин-3-глюкозида

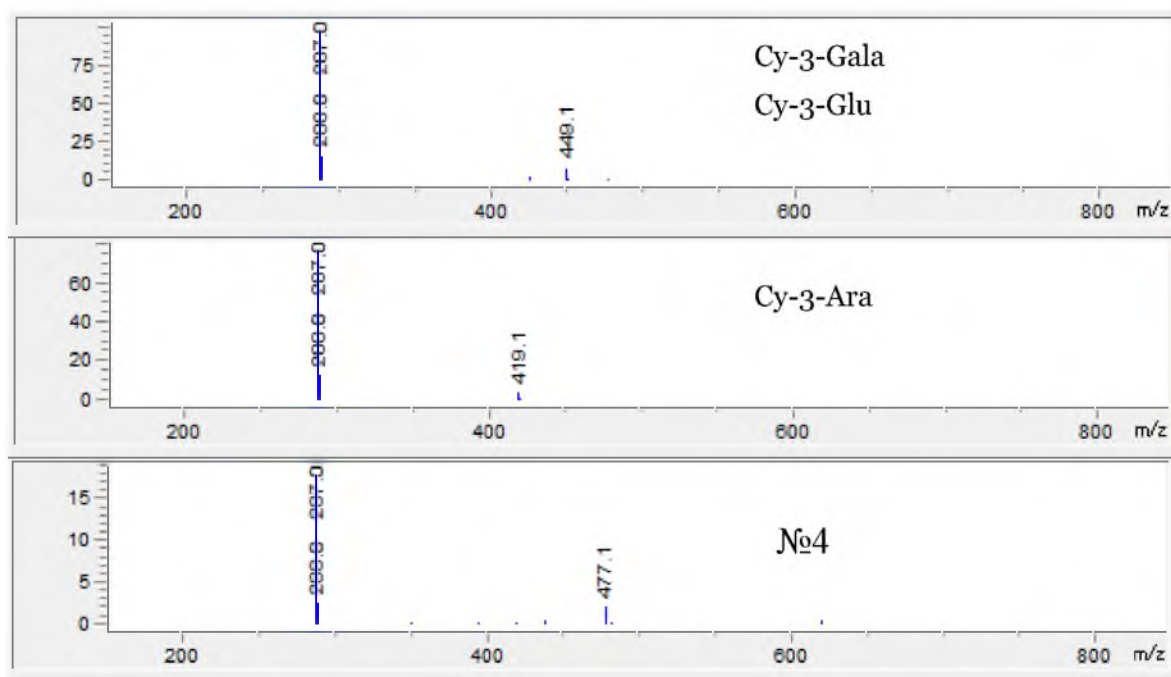


Рис 4. Масс-спектры антоцианов в режиме ESI/MS

Относительно антоцианов, соответствующих пикам №4 и №5, можно отметить то, что они действительно являются производными цианидина. Это следовало из ана-



лиза спектров в видимой области электромагнитного излучения и подтверждается тем, что основным ионом для них является ион незамещенного цианидина с $M/z = 287$. Но в случае пика №4 обнаруживается сигнал с отношением M/z , равным 477, что соответствует ацилированному уксусной кислотой пентозиду цианидина. В то время как для пика №5 достоверно обнаружить фрагменты размером больше неацилированного цианидина не удается.

Как отмечалось выше, биологическая активность и польза для организма многих плодов связана не только с такими нутриентами, как углеводы, белки, витамины, микроэлементы и пр., но и с антиоксидантной активностью накапливаемых в них соединений. Из них на особом счету находятся антоцианы, как высоко активные водорастворимые антиоксиданты, поэтому концентрация этих веществ принципиально важна для составления сбалансированной диеты в современном обществе. В этом отношении весьма темные плоды ирги представляют несомненный интерес. По литературным данным концентрация антоцианов в плодах различных видов ирги не одинакова. В работе [3] при исследовании плодов 16 сортов *A. alnifolia* Nutt. (очень популярного в Канаде растения) в сезонах 1998–2000 годов было установлено, что уровень накопления антоцианов варьировал от 414 мкг на 1 г для сорта «Forestburg» до 852 мкг на 1 г для сорта «Nelson». Это ставит плоды ирги в ряд наиболее богатых антоцианами плодов. Перед определением антоцианов плоды хранили в замороженном при -40°C состоянии в пластиковых контейнерах и сведения о степени вымораживания воды из плодов при этом, к сожалению, не приводятся. Для экстракции плоды (20 г) гомогенизировали в блендере с метанольным раствором (0.1%) HCl (50 мл), оставляли смесь на ночь, фильтровали через фильтровальную бумагу и остаток экстрагировали 200 мл того же экстрагента.

Заметно более скромные, но согласующиеся с ранее опубликованными данными, получены в другой работе канадских исследователей [4]. Они установили, что накопление антоцианов увеличивается по мере созревания (контролируемого по интенсивности окраски) и растет от 26.7 (для вишневой окраски плодов) до 136.8 мг на 100 г для плодов *A. alnifolia* Nutt. сорта «Smoky», причем в пересчете на сухую массу. К сожалению, в работе не приводятся экспериментальные условия, а дается ссылка на другую статью, в которой плоды не хранят в замороженном состоянии и для экстракции используют сложную смесь, содержащую ацетон, который по нашим данным разрушает антоцианы.

Довольно умеренные результаты по накоплению антоцианов в плодах двух сортов *A. alnifolia* приводят и чилийские исследователи [15], но удивительно то, что в экспериментальной части говорится о том, что расчет приводится в мг на 100 г свежих плодов, а в реферате и в таблицах накопление антоцианов приводят 100 г плодов заменяется одним литром (?): 196.7 мг (для сорта «Honeywood») и 213.6 мг (для сорта «Martin»).

В исследованиях, выполненных в России (Рязанская область) [5], в плодах ирги обыкновенной *Amelanchier ovalis* Medik, найдено от 4 до 5 % антоцианов в пересчете на сухой остаток. Результаты спектрофотометрического определения суммы антоцианов (в пересчете на цианидин-3-глюкозид) в плодах шести видов ирги, выращенный в 2011 году, представлены в таблице.

Таблица

Сумма антоцианов в плодах ирги

Вид ирги	Содержание, г/100 г свежих плодов
<i>A. spicata</i> (Lam.) C. Koch (№1)	0.199
<i>A. spicata</i> (Lam.) C. Koch (№2)	0.129
<i>A. alnifolia</i> (Nutt.) Nutt. Ex M.Roem (№1)	0.276
<i>A. alnifolia</i> (Nutt.) Nutt. Ex M.Roem (№2)	0.273
<i>A. sanguinea</i> (Pursh) DC	0.102
<i>A. laevis</i> Weigand	0.126
<i>A. canadensis</i> (L.) Medik	0.255
<i>A. floribunda</i> Lindl	0.249



Как следует из представленных данных, наибольшая концентрация антоцианов обнаружена в плодах ирги ольхолистной, канадской и обильноцветущей (0.250 – 0.275 г на 100 свежих плодов), а самый маленький уровень накопления этих антиоксидантов найден в плодах ирги кроваво-красной (0.102 г на 100 г свежих плодов). При массовой доле сухих веществ порядка 20%, максимальное содержание антоцианов окажется немногим выше 1 % от сухого остатка.

Заключение

Плоды ирги могут рассматриваться как ценный функциональный продукт, богатый природными антиоксидантами – антоцианами. Их накопление в плодах ирги некоторых видов (*A. alnifolia* (Nutt.) Nutt. Ex M.Roem, *A. canadensis* (L.) Medik и *A. floribunda* Lindl) сопоставимо с уровнем этого параметра в плодах черной смородины, хотя в черной смородине антоцианы сконцентрированы только в кожуре, а в плодах ирги они равномерно распределены по всему объему.

Список литературы

1. Handbook of Antioxidants. Ed. Enrique Cadenas, Lester Packer. LLC Marcel Dekker, Taylor & Francis Group, New York, Basel, 2002. – 602 p.
2. Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications Ed. Øyvind M. Andersen, Kenneth R. Markham, CRC Press, Taylor and Francis Group. 2006 – 1212 p.
3. Zatylny A.M., Ziehl W.D., St-Pierre R.G. Physicochemical properties of fruit of 16 saskatoon (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) cultivars // Can. J. Plant Sci. – 2005. – V.85. – P. 933–938.
4. Ozga J.A., Saeed A., Reinecke D.M. Anthocyanins and nutrient components of Saskatoon fruits (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) // Can. J. Plant Sci. – 2006. – V.86. – P. 193–197.
5. Макарова В.Г., Лаксаева Е.А., Мартынов Е.Г. Влияние микроэлементов на накопление некоторых БАВ в плодах ирги обыкновенной // Росс. Мед.-биол. Вестник. – 2006. – №3. – С. 29–35.
6. Вересковский В.В., Шапиро Д.К., Наружная Т.И. Антоцианы плодов различных видов рода *Amelanchier* Medic. // Химия Прир. Соедин. – 1982. – №4. – С. 522–523.
7. Кукулина А.Г. Натурализация североамериканских видов ирги (*Amelanchier* Medik.) во вторичном ареале // Росс. Ж. Биол. Инвазий. – 2011. – №1. – С. 52–59.
8. Adhikari D.P., Francis J.A., Schutzki R.E., Chandra A., Nair M.G. Quantification and characterisation of cyclo-oxygenase and lipid peroxidation inhibitory anthocyanins in fruits of *Amelanchier* // Phytochem. Anal. – 2005. – V.16. – P. 175–180.
9. Mazza G. Anthocyanins and other phenolics of saskatoon berries *Amelanchier alnifolia* Nutt. // J. Food Sci. – 1986. – V.51. – P. 1260–1264.
10. Дейнека В.И., Григорьев А.М., Дейнека Л.А., Ермаков А.М., Сиротин А.А., Староверов В.М. Анализ компонентного состава антоцианов плодов и жирных кислот масел семян некоторых видов семейства *Rosaceae* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Растительные ресурсы. – 2005. – Вып.1. – С. 91–98.
11. Giusti M.M., Ronald E. Wrolstad R.E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy // Current Protocols in Food Analytical Chemistry (2001) F1.2.1-F1.2.13.
12. Дейнека В.И. Карта хроматографического разделения и инкрементные зависимости в методе относительного анализа удерживания в ВЭЖХ // Ж. физ. химии. – 2006. – Т.80, №3. – С. 511–516.
13. Дейнека В.И., Григорьев А.М., Дейнека Л.А., Шапошник Е.И., Староверов В.М. Исследование антоцианов черники в плодах и препаратах на ее основе. // Зав. лаб. – 2006. – №3. – С. 16–20.
14. Дейнека В.И., Григорьев А.М. Относительный анализ удерживания гликозидов цианидина // Ж. физ. химии. – 2004. – Т.78, №5. – С.923–926.
15. Guerrero J.C., Ciampi L.P., Castilla A.C., Medel F.S., Schalchli H.S., Hormazabal E.H., Bensch E.T., Alberdi M.L. Antioxidant capacity, anthocyanins, and total phenols of wild and cultivated berries in Chile // Chilean J. Agric. Res. – 2010. – V.70. – P. 537–544.



ANTHOCYANINS OF SIX SPECIES AMELANCHIER FRUITS

A.N. Chulkov
V.I. Deineka
L.A. Deineka
A.V. Stepanova
V.N. Sorokopudov

*Belgorod National Research
University, 308015 Belgorod,
Pobeda str. 85*

e-mail: deineka@bsu.edu.ru

In the paper the composition of six species of *Amelanchier* fruit harvested in BSU Botanical Garden anthocyanin complex has been investigated by means of HPLC with diode-array and ESI/MS detectors. The main component of the complexes was cyanindine-3-galactoside, while the concentration of cyanidine 3-glucoside as well as that of cyanidine-3-arabinoside was somewhat lower. Two another cyanidine derivative were detected also one of them being acylated with acetic acid 3-pentoside. The highest anthocyanin accumulation was found for fruits of *A. alnifolia*, *A. canadensis* and *A. floribunda* (0.250 – 0.275 g per 100 g of fresh fruits), a lowest of was found in fruits of *A. sanguinea* (0.102 g/100 g).

Key words: anthocyanins, fruits, *Amelanchier* sp., HPLC, ESI/MS